

## University of Groningen

### An ecophysiological study of starter streptococci

Otto, Roelf

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1981

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Otto, R. (1981). *An ecophysiological study of starter streptococci*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

De zuursels die men gebruikt bij de bereiding van Goudse kaas bestaan uit een mengsel van verschillende soorten melkzuurbacteriën (Streptococcus lactis, S. cremoris, Leuconostoc lactis, L. cremoris and soms S. diacetylactis). Binnen de soorten S. lactis en S. cremoris is er vaak ook nog sprake van een bepaalde variatie. Uit zuursels kan men namelijk van deze soorten varianten isoleren die onderling aanzienlijke verschillen vertonen in de snelheid waarmee ze melk kunnen verzuren. Dergelijke varianten worden "langzaam" en "snel" genoemd.

Beide varianten groeien in melk met verschillende snelheid. Als de kweekomstandigheden in melk één van de varianten in het voordeel zou plaatsen en er geen onderlinge interactie zou bestaan, dan zou een mengsel van langzaam en snel verzurende varianten plaats moeten maken voor een rein-cultuur van één van deze twee. De praktijk wijst uit dat dit niet het geval is. Hoewel men heeft waargenomen dat de onderlinge getalsverhouding kan veranderen, blijkt dat na zeer vele overentingen er nog steeds sprake is van een mengcultuur. Interessant is dat de snelle variant in deze mengcultuur soms slechts een klein percentage van de totale populatie uitmaakt. Toch is het bekend dat de snel verzurende varianten sterkere proteolytische eigenschappen bezitten dan de langzame. Deze laatste zijn wat hun aminozuurvoorziening betreft geheel afhankelijk van de snelle variant. De vraag is nu, op welke wijze een langzame variant zich in het mengsel kan handhaven.

De beschikbare literatuur over langzaam en snel verzurende varianten bevat in hoofdzaak gegevens over verschillen in proteolytische activiteit en de genetische achtergrond van deze verschillen. Deze literatuur is samengevat in Hoofdstuk I. Over de relatie tussen langzaam en snel verzurende varianten is nog maar weinig bekend. Het onderzoek zoals beschreven is in dit proefschrift, hoopt bij te dragen tot een vergroting van inzicht in deze relatie.

Het onderzoek is begonnen met een analyse van de groeisnelheden van een langzaam en snel verzurende variant van S. cremoris in melk. Als groeimedium is melk voor de langzaam verzurende variant ongeschikt. Niet alleen de bereikte celdichtheid van deze bacterie maar ook de groeisnelheid bleek relatief laag te zijn (Hoofdstuk II). Alleen als er extra peptiden of aminozuren aan de melk werden toegevoegd was er sprake van een bevredigende groei. Omdat de langzame variant geen noemenswaardige proteolytische activiteit bezit kon de langzame groei verklaard worden vanuit het gebrek aan aminozuren.

In ditzelfde hoofdstuk is aangetoond, dat de snel verzurende variant melkeiwitten hoofdzakelijk tot peptiden afbreekt. De proteolytische capaciteit van dit organisme was voldoende om in een mengcultuur van langzaam en snel verzurende melkzuurstreptococci ook de langzame variant van stikstofverbindingen te voorzien. Dit bleek uit studies gedaan aan mengculturen. Er was in een dergelijke mengcultuur sprake van een hoge celdichtheid van de langzame variant, en van een duidelijke verandering van de onderlinge getalsverhouding ten gunste van de langzame variant. De procentuele toename van de langzame variant in een mengcultuur kon alleen verklaard worden door te veronderstellen dat een overmaat aan aminozuren en peptiden er toe zou leiden dat de langzaam verzurende variant sneller zou groeien dan de snel verzurende. Een analyse van de groeisnelheden van beide varianten in een medium met voldoende peptiden en aminozuren wees uit dat deze veronderstelling juist was (Hoofdstuk II).

Teneinde een indruk te krijgen van de mechanismen die aan de snelle groei van de langzaam verzurende variant in een mengcultuur ten grondslag liggen, werd een onderzoek verricht naar de populatiekinetiek van mengculturen van langzaam en snel verzurende varianten van S. cremoris in energie-gelimiteerde continu culturen. Tevens werd de plasmidendichtheid van beide varianten bepaald. Dit onderzoek is in Hoofdstuk III beschreven. Er zijn aanwijzingen gevonden dat de informatie voor de synthese van de enzymen, die in de snelle variant verantwoordelijk zijn voor de hydrolyse van melkeiwitten, gelegen is op een plasmide. Dit plasmide ontbreekt in de langzame variant: dit verklaart de afwezigheid van proteolytische activiteit in de langzaam verzurende variant.

De snellere groei van de langzaam verzurende variant ten opzichte van de snel verzurende, wordt niet veroorzaakt door een lagere energie-investering in de synthese van plasmiden DNA. Een analyse van de totale hoeveelheid plasmiden DNA in beide varianten heeft uitgewezen dat die hoeveelheid gelijk is. Uit competitie-experimenten in lactose-gelimiteerde continu culturen zijn aanwijzingen verkregen dat de verklaring voor de hoge groeisnelheid van de langzame variant eerder gezocht moet worden in energiebesparingen op het niveau van eiwitsynthese.

In Hoofdstuk IV wordt aandacht besteed aan de rol die peptiden vervullen in het stikstofmetabolisme van S. cremoris. Peptiden bleken een geschiktere stikstofbron voor de langzaam en snel verzurende variant dan aminozuren. In batch culturen kwam dit tot uiting in hogere groeisnelheden, in lactose-gelimiteerde continu culturen door een hogere celopbrengst. De hogere celopbrengst van S. cremoris in een lactose-gelimiteerde continu cultuur met peptiden als stikstofbron kon verklaard

worden vanuit de aanname dat transport van aminozuren in de vorm van peptiden minder energie vereiste dan transport van losse aminozuren. Tevens is aangetoond, dat extracellulair lactaat de groei van S. cremoris in een medium met vrije aminozuren aanzienlijk verlaagt. In een medium met peptiden was dit niet het geval.

In Hoofdstuk V en VI is het onderzoek naar de remming van de groei door lactaat van S. cremoris in een medium met vrije aminozuren beschreven. Uit studies gedaan aan intacte cellen van S. cremoris zijn aanwijzingen verkregen dat export van lactaat door deze bacteriën een proces is waarbij energie vrijkomt, die wordt geconserveerd in de vorm van een electrochemische protonen gradient. Een verhoging van de extracellulaire lactaat concentratie heeft tot gevolg dat er minder energie bij dit proces vrijkomt, hetgeen in batch culturen leidt tot een verlaging van de groeisnelheid. Door de effecten van extracellulair lactaat op de celopbrengst van S. cremoris in een lactose-gelimiteerde continu cultuur te onderzoeken, kon een schatting worden gemaakt van de bijdrage die het lactaat export systeem levert aan het energie metabolisme van deze bacterie. Deze bijdrage bedraagt ongeveer 12% van de totale hoeveelheid ATP die op substraatniveau uit lactose gevormd wordt.

In Hoofdstuk VI worden inleidende experimenten beschreven met geïsoleerde membraanblaasjes van S. cremoris. Dergelijke membraanblaasjes zijn in tegenstelling tot intacte cellen vrij van intracellulaire energiedragers zoals ATP. Ze zijn daarom uitermate geschikt voor de studie van lactaatexport. Worden dergelijke blaasjes opgeladen met lactaat en vervolgens uitverdund in een lactaatvrij medium, dan stroomt lactaat naar buiten. Deze uitstroom gaat samen met de vorming van een electrochemische protonen gradient ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ) over het membraan. Deze  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  representeert een hoeveelheid energie. Aangetoond werd dat de  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  in S. cremoris de drijvende kracht is voor o.a. de opname van een aantal aminozuren.

In Hoofdstuk VII worden de resultaten beschreven van een onderzoek naar de oecologische implicaties van energiegenerering door lactaat export. Een verhoging van de extracellulaire lactaat concentratie heeft tot gevolg dat minder energie vrijkomt bij de export van lactaat door S. cremoris. In een mengcultuur van S. cremoris en Pseudomonas stutzeri heeft lactaatconsumptie door de pseudomonas tot gevolg, dat de celopbrengst van de streptococ aanzienlijk wordt verhoogd. De resultaten van de in Hoofdstuk V, VI en VII beschreven onderzoeken werpen een nieuw licht op energiegenerering in gistingsbacteriën en op relaties tussen gistingsbacteriën en bacteriën die gistingsproducten consumeren.